

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-203734

(43) 公開日 平成9年(1997)8月5日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/531			G 0 1 N 33/531	A
C 0 7 K 16/32	Z N A		C 0 7 K 16/32	Z N A
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	D
33/574			33/574	A
33/577			33/577	B
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 17 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-11695

(22) 出願日 平成8年(1996)1月26日

(71) 出願人 000002130

住友電気工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

(72) 発明者 岸本 利彦

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電

気工業株式会社横浜製作所内

(72) 発明者 田村 隆明

千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 千葉

大学理学部生物学科分子細胞生物学講座内

(72) 発明者 牧野 泰孝

千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 千葉

大学理学部生物学科分子細胞生物学講座内

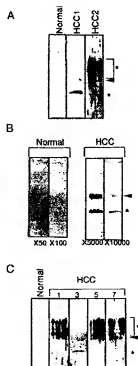
(74) 代理人 弁理士 上代 哲司 (外2名)

(54) 【発明の名称】 抗血清、抗体、リガンド及びそれらの検出方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、発癌過程で発現が増加する蛋白質に対する抗血清、抗体及びリガンド並びにそれらの検出試薬及び検出方法の提供を課題とするものである。

【解決手段】 サブトラクション法及びドットスクリーニング法を用いて肝癌で発現が増加する遺伝子を単離し、該遺伝子の塩基配列を決定し、さらに該遺伝子がコードするアミノ酸配列を決定し、該アミノ酸配列からなる蛋白質に対する抗血清及び抗体を作製し、また、該抗血清及び該抗体を検出する試薬に該アミノ酸配列のうちの免疫原性を有する連続する8残基以上の一部又は全部からなる蛋白質を含ませ、肝癌の発症を簡便にスクリーニングすることを可能とする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸から成る蛋白質に対する抗血清。

【請求項2】 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸から成る蛋白質に対する抗体。

【請求項3】 ポリクローナル抗体である請求項2に記載の抗体。

【請求項4】 モノクローナル抗体である請求項2に記載の抗体。

【請求項5】 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸から成る蛋白質に対するリガンド。

【請求項6】 請求項1に記載の抗血清を検出する試薬であって、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの免疫原性を有する連続する8残基以上の一部又は全部から成る蛋白質を含むことを特徴とする検出試薬。

【請求項7】 請求項2ないし4のいずれか1項に記載の抗体を検出する試薬であって、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの免疫原性を有する連続する8残基以上の一部又は全部から成る蛋白質を含むことを特徴とする検出試薬。

【請求項8】 請求項5に記載のリガンドを検出する試薬であって、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの免疫原性を有する連続する8残基以上の一部又は全部から成る蛋白質を含むことを特徴とする検出試薬。

【請求項9】 請求項6に記載の検出試薬を含むことを特徴とする検出キット。

【請求項10】 請求項7に記載の検出試薬を含むことを特徴とする検出キット。

【請求項11】 請求項8に記載の検出試薬を含むことを特徴とする検出キット。

【請求項12】 請求項6に記載の検出試薬を用いて、抗血清を検出する方法。

【請求項13】 請求項7に記載の検出試薬を用いて、抗体を検出する方法。

【請求項14】 請求項8に記載の検出試薬を用いて、リガンドを検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、発癌過程で発現が増加する蛋白質に対する抗血清、抗体及びリガンド並びにそれらの検出試薬及び検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 癌の発症は遺伝子の何らかの異常によって起こることが知られており、特に、遺伝子の転写レベルの変動異常が癌の発症の主たる原因と考えられている（『Science』Vol. 222、1983年、pp765〜771）。この遺伝子の取得には、癌組織に対するモノクローナル抗体を複製し、得られたモノクローナル抗体の中から、癌組織にのみ

反応する抗体を選別し、

③次いでこのモノクローナル抗体に反応する抗原となるべき蛋白質を同定し、

④得られた蛋白質の情報をもとに遺伝子プローブと呼ばれるものを複製し、

⑤この遺伝子プローブを用いて、遺伝子ライブラリーと呼ばれる遺伝子の集団から選択する方法が用いられていた（『Molecular Cloning Second Edition』（Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年）chapter 8、9、12）。また、同書chapter 8、9、11、12にはモノクローナル抗体を用いて遺伝子ライブラリーから目的とする遺伝子を選別する方法が示されている。

【0003】 しかしながらこれらの方法を用いることでは、目的とする蛋白質が量的に多いこと、あるいは、モノクローナル抗体を用いる場合には抗原蛋白質が細胞表面のものであり、かつ抗原性の高いものであることが必要条件となっているため、これらに該当しない蛋白質は、取得することが非常に困難であり、従ってその蛋白質をコードする遺伝子の取得も非常に困難であった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、発癌過程で発現が増加する新規な蛋白質、該蛋白質をコードする新規な遺伝子及び該蛋白質に対する抗体の提供を課題とするものである。また、本発明は、該蛋白質、該遺伝子又は該蛋白質に対する抗体を検出する方法を提供することを課題とするものである。さらには、該蛋白質、該遺伝子又は該蛋白質に対する抗体を用いて癌の発症を容易にスクリーニングできるようにすることを課題とするものである。特に、肝癌に対して特異的な遺伝子として取得された遺伝子、蛋白質又は該蛋白質に対する抗体を用いることにより、あるいは該遺伝子、該蛋白質又は該抗体を検出することにより、簡便に癌の発症をスクリーニングする方法の提供を課題とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上記課題解決のために、鋭意検討を重ねた結果、サブトラクション法を用いてラット肝癌に特異的に発現している遺伝子を抽出し、ドットスクリーニング法を用いて肝癌で発現が増加する遺伝子を単離し、該遺伝子をGAD1I遺伝子と名付けた。そして、該遺伝子の塩基配列を決定し、さらに該遺伝子がコードするアミノ酸配列を決定した。また、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法によりGAD1I遺伝子が肝癌特異的な遺伝子であることを確認した。さらに、該cDNAがコードするGAD1I蛋白質を組み換え体大腸菌に発現させ、該蛋白質が天然物と同じものであることを確認した。次に、該蛋白質をウサギに免疫し、該蛋白質に対する抗体を取得した。そして、該抗体とGAD1I蛋白質とが反応することを確認

した。これより、動物から正常に比し過剰量のGAD I I 遺伝子又はGAD I I 蛋白質が検出されれば、該動物が肝癌であると考えてよいことを明らかにした。

【0006】次に、動物からGAD I I 蛋白質又はGAD I I 遺伝子を簡便に検出する方法であるが、遺伝子の検出は、該遺伝子を発現している細胞から遺伝子抽出しなければならず、どうしても手間がかかってしまう。そこで、GAD I I 蛋白質を検出することを検討した。しかし、癌であるかどうか知りた組織の細胞から蛋白質を取り出す方法は患者に与える負担が大きく、簡便な方法とは言い得ない。そこで、本発明者は、通常行われている血液検査レベルで実施可能な簡便な方法の検討を行った。

【0007】すなわち、本発明者は、蛋白質を利用して、肝癌特異的な現象の検出ができないか検討した。そこで、まずGAD I I 蛋白質と被験動物の血清を反応させることを試みた。具体的にはウェスタンブロット法を試行したが、GAD I I 蛋白質と血清を反応させると肝癌特異的なバンドが検出されることが判明した。このことは、血清中に抗GAD I I 抗体が天然に存在することを示し、該抗体を検出することにより、肝癌の発症を簡便にスクリーニングすることが可能であることが明らかとなった。また、GAD I I 遺伝子が肝臓以外の臓器にも発現することを明らかにし、肝癌以外の癌の発症をスクリーニングすることが可能であることを明らかとした。

【0008】これらにより、本発明は、(1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸から成る蛋白質に対する抗血清、(2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸から成る蛋白質に対する抗体、(3) ポリクローナル抗体である(2)に記載の抗体、(4) モノクローナル抗体である(2)に記載の抗体、(5) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸から成る蛋白質に対するリガンドを提供するものである。

【0009】また、本発明は、(6) (1)に記載の抗血清を検出する試薬であって、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの免疫原性を有する連続する8残基以上の一部又は全部から成る蛋白質を含むことを特徴とする検出試薬、(7) (2)ないし(4)のいずれか1項に記載の抗体を検出する試薬であって、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの免疫原性を有する連続する8残基以上の一部又は全部から成る蛋白質を含むことを特徴とする検出試薬、(8) (5)に記載のリガンドを検出する試薬であって、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの免疫原性を有する連続する8残基以上の一部又は全部から成る蛋白質を含むことを特徴とする検出試薬、(9) (6)に記載の検出試薬を含むことを特徴とする検出キット、(10) (7)に記載の検出試薬を含むことを特徴とする検出キット、(11) (8)に記載の検出試薬を含むことを特徴とする

る検出キット、(12) (6)に記載の検出試薬を用いて、抗血清を検出する方法、(13) (7)に記載の検出試薬を用いて、抗体を検出する方法、(14) (8)に記載の検出試薬を用いて、リガンドを検出する方法を提供するものである。

【0010】また、本発明は、(15) (6)ないし(8)に記載の検出試薬又は(9)ないし(11)に記載の検出キットを用いて、(1)に記載の抗血清、(2)ないし(4)のいずれか1項に記載の抗体又は(5)に記載のリガンドを検出するステップを含むことを特徴とする癌のスクリーニング方法、(16)癌が肝癌、腎臓癌又は肺癌である(15)に記載の癌のスクリーニング方法を提供するものである。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明では、後述するように、実施例としてラットの肝臓から、肝癌に特異的に存在する遺伝子を単離し、該遺伝子について塩基配列を決定し、それをGAD I I 遺伝子と命名した。該遺伝子がコードする蛋白質(GAD I I 蛋白質)についてもそのアミノ酸配列を決定した。ところで、異種間の同一機能の蛋白質については、種によってそのアミノ酸配列にいくらかの相違はあるが、30%~40%以上のホモロジーがあるとい一般的に言われている。今回単離した蛋白質についても、該蛋白質と同じ機能を有し、かつ該蛋白質とのホモロジーが30%以上、好ましくは40%以上である蛋白質をラット以外の哺乳動物が有していることは当然のことと考えられる。ここでいうホモロジーがあるということは、一般に言われているのと同じく、同族アミノ酸をポジティブとカウントする算出法によるものであり、アミノ酸鎖の長さが異なる場合は、アミノ酸鎖が短い方の蛋白質の長さに対して、ホモロジーがある部分の割合がいくらかを表す。

【0012】したがって、本発明のGAD I I 蛋白質はそれらが由来する動物の種によらず、以下の2点により特徴付けされる。

①肝癌において発現が増加すること。

②配列表の配列番号に記載の塩基配列と30%以上、好ましくは40%以上のホモロジーを有すること。

肝癌で特異的にみられるかどうかについては、例えば実施例4に示した10%電気泳動法を用いて確認すればよい。本発明のGAD I I 蛋白質をコードする遺伝子は、それぞれ上で定義したGAD I I 蛋白質をコードする遺伝子である。

【0013】本発明は、GAD I I 蛋白質の抗原性を、実施例4に例示するように、該蛋白質が由来する哺乳動物の血清に天然に抗体が存在することにより明らかにするものである。また、本発明は、精製されたGAD I I 蛋白質をヒトを除く哺乳動物に免疫することで、抗GAD I I 抗体が獲得されることを明らかにするものである。抗原性が明らかとなった物質については、免疫感受

によってポリクローナル抗体が得られるならば、該免疫した動物のリンパ球を用いたハイブリドーマによりモノクローナル抗体が産生されることはよく知られている(『Antibodies A Laboratory Manual』(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) Chapter 6)。したがって本発明はGAD II蛋白質に対するモノクローナル抗体もその範囲内に含むものである。また、免疫原として、免疫源性を有する蛋白質の一部をウシ血清アルブミンなどの他のキャリアー蛋白質に結合させたものを用いることは、よく用いられる方法である。該蛋白質の一部は、例えばペプチド合成機を用いて合成してもよい。なお、免疫源性を有する蛋白質の一部としては、8アミノ酸残基以上であることが好ましい。

【0014】GAD II蛋白質の検出については、抗体を用いる方法、酵素反応を利用する方法、その遺伝子を検出する方法が挙げられる。抗体を用いる方法としては、具体的には、

①GAD II蛋白質に対する抗体を用いてGAD II蛋白質を検出する方法、

②GAD II蛋白質に対する抗体を用い、且つ該抗体を標識し、該標識によりGAD II蛋白質を検出する方法が挙げられる。

標識としては、放射性同位元素(RI)、酵素、アビジンもしくはビオチン、又は蛍光物質(FITCやローダミン等)が利用される。また、該標識がなされた二次抗体により標識する方法も利用される。二次抗体としては、抗IgG抗体等の抗原特異性の広いものが好ましい。酵素反応を利用する方法としては、例えば、ELISA、免疫凝集法、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリを用いた方法又はそれらに類似する方法が挙げられる。

【0015】また、GAD II蛋白質を利用して、GAD II蛋白質と反応する抗体又はGAD IIリガンドを検出することが可能である。具体的には、

①GAD II蛋白質を標識して抗GAD II抗体又はGAD IIリガンドと反応させ、該標識により該抗体又はリガンドを検出する方法、

②担体に固定したGAD II蛋白質に抗GAD II抗体やGAD IIリガンドを反応させ、また該抗体又は該リガンドを標識し、該標識により該抗体又はリガンドを検出する方法が挙げられる。

いずれの場合も、標識は、上述のものと同様に利用可能である。また、上記の酵素反応を利用する方法も利用可能である。なお、GAD II蛋白質のリガンドにはPLP(ピリドキサル5'リン酸)等の補酵素やグルタマートデカルボキシラーゼ等の酵素が触媒し得る基質が挙げられる。

【0016】また、遺伝子を検出する方法としては、具体的

的には、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法やRT-PCR法(『Current Protocol in Molecular Biology』(Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience) Chapter 15)又はインサイチュハイブリダイゼーション法(同書Chapter 14)が挙げられる。なお、ハイブリダイズの条件は、プローブの長さや使用するメンブランにより最適な条件が異なる。つまり、ハイブリダイズ条件は必ずから或る幅をもつものである。本発明の実施例では、使用したメンブランの性質と得ようとしたプローブの長さにおける最適な条件を開示するものであり、メンブランやプローブの長さが異なれば当然異なるハイブリダイズ条件でもハイブリダイズし得る。例えば、ピロリン酸ナトリウムがなくてもハイブリダイズする場合もある。その範囲としては、以下の条件が好適に使用可能である。

【0017】ハイブリダイズ条件：

①プレハイブリダイゼーション

5 以上10以下xSSC

5 以上10以下xDenhardt's

1M以下のピロリン酸ナトリウム(pH6.8)

30以上50%以下ホルムアミド

0.1以上1%以下のSDS

約100μg/ml酵母tRNA

約100μg/ml熱変性DNA

反応温度35ないし42℃

反応時間50分以上1時間10分以下

【0018】②ハイブリダイゼーション

30 5 以上10以下xSSC

5 以上10以下xDenhardt's

1M以下のピロリン酸ナトリウム(pH6.8)

30ないし50%ホルムアミド

1%以下のSDS

約100μg/ml酵母tRNA

約100μg/ml熱変性DNA

1x10⁵ないし2x10⁶cpm/ml cDNA
プローブ

反応温度35ないし42℃

40 反応時間12時間以上20時間以下

なお、バックグラウンドを気にしなくてよいのであれば、上記のうち、ピロリン酸ナトリウム(pH6.8)、又はSDSは加えなくともよい。

【0019】これらの遺伝子の検出のために用いるプローブはDNAでもRNAでもどちらでも用いることができる。さて、ヒトの蛋白質の種類は3x10⁵個といわれている。16塩基のDNAは4¹⁶種類存在するので、この長さのDNAがあればヒトの蛋白質を全て識別できる。すなわち、プローブとして必要な長さは理論的には16塩基である。実用上もこの長さ以上であることが望

ましいことは言うまでもないが、実用的には12塩基以上のものが用いられることが多い。また、プローブとして用いる箇所は非コード領域、コード領域のいずれも使用可能である。また、プローブとして用いる箇所は、GC含有率が30~70%であれば、非コード領域、コード領域のいずれも使用可能である。

【0020】DNA又はRNAをを化学合成・酵素合成すると共に、側鎖をメチル化すること、あるいはデオキシ化すること、もしくはリン酸基部分のOをS置換すること等の化学的に修飾することはよく知られている。化学合成時に導入できる修飾として、例えば、1) ビオチン化、2) メチル化、3) ジコクシゲニン化、4) 脱リン酸化、5) 蛍光標識化(フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッドおよびその誘導体)、6) アミノ化、7) リン酸基のSをOに置換したDNA、RNAの合成が主として挙げられる。また、酵素的に導入できる化学修飾としては、例えば、1) ビオチン化、2) メチル化、3) ジコクシゲニン化、4) 脱リン酸化、5) 蛍光標識化(フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッドおよびその誘導体)、6) 酵素標識化(アルカリフォスファターゼ)が主に挙げられる。配列表の配列番号2に記載のDNAを化学合成すると共に、上記の化学的又は酵素的化学修飾を行い、配列表に示されたDNAそのものと異なるものを合成することが可能である。したがって、本発明のDNA及びRNAは、該化学修飾されたDNA及びRNAをその範囲に含むものである。

【0021】GAD11蛋白質の検出による癌のスクリーニングについては、被検者から採取した組織又は細胞中に該蛋白質が存在するかを調べることにより行える。すなわち、被検者から採取した組織又は細胞中に該蛋白質の発現が正常組織又は正常細胞での発現に比して有意差が認められれば該患者は癌である疑いが極めて強い。また、GAD11蛋白質が細胞外に分泌又は放出される場合には、被検者の組織や体液中のGAD11蛋白質の有無を調べるにより癌のスクリーニングが可能である。これらの検出方法について、具体的に、前記のGAD11蛋白質の検出方法がある。

【0022】またGAD11蛋白質と反応する抗体又はGAD11リガンドの検出による癌のスクリーニングについては、該抗体又はリガンドを体液(例えば血清)や組織から検出することにより可能である。検出方法としては、前記のGAD11と反応する抗体又はGAD11リガンドを検出する方法がある。GAD11リガンドは、癌の発症により、正常時のリガンドと違う癌特有のリガンドがGAD11蛋白質と結合するようになることが考えられ、これを利用した癌のスクリーニング方法も可能である。

【0023】また、遺伝子による癌の診断については、被検者から採取した組織又は細胞中に該遺伝子が存在するかを調べることにより行える。遺伝子の検出方法は、前

記のようにノーザンブロットハイブリダイゼーション法やRT-PCR法、インサイチュハイブリダイゼーション法が挙げられる。

【0024】以下に実施例を示し、本発明をさらに詳述するが、本発明はこの例に限定されるものではない。なお、酵素に関しては、特に記載がない限り、宝酒造製のもの、当該酵素の使用説明書に従って用いた。

＜実施例1＞肝癌で発現の増加する蛋白質をコードする遺伝子の単離

1. 肝癌ラットの作製

肝癌ラットは、ソルトファーバー法(『Nature』Vol. 263, 1976年, pp701~703)を基として作製した。実際には、5週齢のウィスター系ラット(船橋農場製)にジェチルニトロサミン(DEN)を腹腔内投与し、二週間後2-アミノアセチルフルオレン(AAF)を0.02%含むM飼料(オリエンタル酵母製)の経口投与を開始し、さらにその一週間後再生手術を施した。DEN投与後12, 24, 48時間及び1, 3, 5, 7ヵ月後に肝臓を摘出し、後のRNA調製に使用した。また、各ラットより採血を行い、血清を取得した。なお血清は-80℃にて保存し、後のウエスタンブロットに用いた。

【0025】2. RNAの調製
全RNAは、『Methods in enzymology』Vol. 154 (Academic Press Inc., 1987年) pp3~28に記載の方法を基として調製した。

(1) 実際には、各肝臓を3gずつ液体窒素中で粉砕し、100mlの5.5MGTC溶液(グアニジンチオシアネート5.5mM、N-ラウロニルサルコシ0.5%、25mMKエンセナトリウム、pH7.0)に加え、ポッター型ホモナイザーでホモジネートした。

(2) 溶液を、3000rpm、10分間遠心分離した後、上清液をSW28スイングローター用遠心管(ベックマン製)に加えておいた比重1.6g/mlのセウムトリフルオロ酢酸溶液(セウムトリフルオロ酢酸(ファルマシア製)50%、100mMエチレンジアミン四酢酸ナトリウム(EDTA)(pH7.0))12mlに重層し、SW28スイングローターを用いて2

5000rpm、24時間、15℃で分離を行った。

【0026】(3) 沈殿物を、6000rpmの4M GTC溶液に溶かし、15000rpmで遠心分離し、溶液部分を回収した。1M酢酸を15μl、エタノール450μlを加え、15000rpm、10分間遠心分離し、沈殿を回収した。

(4) この沈殿を、適量(約3ml)のTE溶液(1mM Tris-Cl(pH7.5), 1mM EDTA)に溶かし(溶けるまでTE溶液を加えた)、1500rpmで遠心分離し、溶液部分を回収した。

(5) 溶液と同量のフェノール/クロロホルムを混合

し、15000rpm、10分間遠心分離し、溶液部分を回収した。

(6) 溶液に1/10容量の3M酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加え、2.5倍量のエタノールを加え、-20℃で2分間放置後、15000rpmで遠心分離し、沈殿を70%エタノールで洗浄後、乾燥させ、適量のTE溶液に溶かし、-80℃で保存した。各肝臓から5~7mgの全RNAが得られた。

(7) polyA RNAは、oligotex dT30 super[®] (日本ロッッシュ製)を用いて、取扱説明書の通りに行った。用いた全RNAの量は一回当たり1mgで、oligotex dT30 super[®]を750μlを用いてpolyA RNAの精製を行った。各肝臓において、1mgの全RNAから約20μgのpolyA RNAが得られた。

【0027】3. cDNAサブトラクション
これは、原らの方法(『Analytical Biochemistry』Vol. 214, 1993年、pp58~64)に準じて行った。

(1) 実際には、用いた材料となるpolyA RNAは、7カ月肝癌、及び正常肝臓のもので、各15μgを用いた。

①該polyA RNAは、それぞれoligotex*

cDNA溶液	69μl
10xTaq緩衝液(パーキンエルマー製)	10μl
1.25mM dNTP	16μl
EcoRI-(dG) ₁₂ プライマー(2μg/μl)	2μl
XhoI-(dT) ₁₂ プライマー(2μg/μl)	2μl
Taqポリメラーゼ(パーキンエルマー製)(5u/μl)	1μl

計100μl

【0029】(2) ①サブトラクション処理後、得られた遺伝子ライブラリーをEcoRI(宝酒造製)で切断した。反応系は次の条件とした。

遺伝子溶液	10μl
10xH buffer	10μl (宝酒造製)
EcoRI	5μl (宝酒造製)
滅菌水	75μl

計100μl

反応温度 37℃

反応時間 一晚

②EcoRI切断後、100μlのフェノール/クロロホルムを混合し、15000rpmで遠心分離し、水溶液部分を回収した。この溶液に10μlの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)を加え、250μlのエタノールを加えた後、15000rpmで遠心分離し沈殿を回収した。

③回収した沈殿を70%エタノール1mlで洗浄し、乾燥させた後、75μlの滅菌水に溶解させた。これを下記組成の液として37℃で一晩反応させ、XhoIで切断した。

* dT30 super[®]に吸着させた後、その状態でcDNAの合成反応を行った。合成反応の条件は文献の通りに行った。

④肝臓のcDNA-oligotex dT30 super[®]には、ターミナルデオキシトランスフェラーゼ(宝酒造製)でpoly dC tailを付加し、EcoRI-(dG)₁₂プライマーとTaqポリメラーゼ(パーキンエルマー製)でセンス鎖のcDNAを合成した。

10 このセンス鎖cDNAと正常肝臓のcDNA-oligotex dT30super[®]の間で該cDNAサブトラクション反応を行った。

【0028】⑤反応後得られたcDNA溶液はEcoRI-(dG)₁₂及びXhoI-(dT)₁₂の2プライマーを用いてPCR反応(『Current Protocols in Molecular Biology』(1987年、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience社)Chapter15に記載の方法)に準じて増幅した。PCRの条件は、以下の組成の溶液で、1サイクルを94℃で90秒、次に55℃で2分、次に72℃で3分反応させることとして、25サイクル行った。

遺伝子溶液	75μl
1%BSA	10μl (宝酒造製)
10xH buffer	10μl (宝酒造製)
XhoI	5μl (宝酒造製)

計100μl

反応温度 37℃

反応時間 一晚

40 【0030】(3) 100μlのフェノール/クロロホルムを混合し、15000rpmで遠心分離し、水溶液部分を回収した。この溶液に10μlの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)を加え、250μlのエタノールを加えた後、15000rpmで遠心分離し沈殿を回収し、70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し乾燥した後、100μlの滅菌水に溶解させ、遺伝子ライブラリー溶液を調整した。

【0031】4. サブトラクション後の遺伝子のベクターへの導入

(1) pBluescript I Iベクター(ストラタジーン製)をEcoRI, XhoI(宝酒造製)で切断した。切断条件は、3. (2)で示した条件を用いた。

(2) 切断された pBluescript II ベクターの切断端の脱リン酸化を bacterial alkaline phosphatase (宝酒造製) を用いて、65℃で1時間反応させて行った後、100 μ l のフェノール/クロロホルムを混合し、15000 rpm で遠心分離し、水溶液部分を回収した。

【0032】(3) この溶液に10 μ l の3M酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加え、250 μ l のエタノールを加えた後、15000 rpm で遠心分離し沈殿を回収し、70%エタノール1ml で沈殿を洗浄し乾燥した後、100 ng/ μ l になるように滅菌水に溶解させた。

(4) 3. で得られた遺伝子ライブラリー溶液と、切断、脱リン酸化を行った pBluescript II ベクターを ligation packTM (日本ジーン製) の使用要領に従い、混合、反応させることでライブラリーの各遺伝子をベクターに挿入した。

【0033】5. サブトラクション後の遺伝子の大量菌への導入

常法に従い、4. (4) で反応させた反応液を全て、E. coli JM109 コンピテントセル (宝酒造製) に混合し、氷上で30分間、42℃で45秒間、氷上で3分間反応させた後、SOC 培地 900 μ l を加え、37℃、1時間置き、ベクターを E. coli JM109 に導入した。その後、E. coli JM109 を回収した。

【0034】6. 遺伝子の抽出

(1) この大腸菌を、下記の組成の LB 寒天培地に置き、一晚培養することによってコロニーを形成させた。

LB 寒天培地の組成

アンピシリン (和光純薬製) 100 μ g/ml

IPTG (宝酒造製) 0.1 mM

X-gal (宝酒造製) 0.004%

形成されたコロニーのうち、白色のコロニーを選択して後の遺伝子のスクリーニングに用いる種菌とした。

(2) 種菌を2000種類選択し、各々をアンピシリンを100 μ g/ml 含む2ml の LB 液体培地で培養した後、『Molecular Cloning Second Edition』(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989 年) Chapter 1 に記載のアルカリ法で遺伝子を抽出した。

【0035】7. ドットブロットスクリーニング

(1) 抽出した遺伝子は、Bio Dot (バイオラッド製) を用いて各々2枚のナイロンメンブラン (ミリアポ製) に結合させ、水酸化ナトリウム水溶液で遺伝子を変性させた後、UV クロスリンカー (ストラタジーン製) により固定を行った。遺伝子の変性は以下の条件で行った。

① 0.1 M 水酸化ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウム

溶液に20秒反応させた。

② その後、0.2 M Tris-Cl (pH 7.5)、0.15 M 水酸化ナトリウム溶液と2分間反応させた。

③ その後、2x SSC で2分間反応した。

(2) 2. で作製した肝臓 polyA RNA 及び正常肝臓 polyA RNA より、放射性 CTP (α -³²P-dCTP) (アマシャム製) を用いて AMV 逆転写酵素 (生化学工業社製) により逆転写反応を行うことで、それぞれの polyA RNA から cDNA プローブを作製した。

(3) (1) でナイロンメンブランに固定した遺伝子と (2) で作製した cDNA とを以下の条件でハイブリダイゼーションさせた。

【0036】① プレハイブリダイゼーション

5x SSC

5x Denhardt's

0.1 M ピロリン酸ナトリウム (pH 6.8)

50%ホルムアミド

0.5% SDS

20 100 μ g/ml 酵母 tRNA

100 μ g/ml 変性サケ精子 DNA

反応温度 42℃

反応時間 1時間

② ハイブリダイゼーション

5x SSC

5x Denhardt's

0.1 M ピロリン酸ナトリウム (pH 6.8)

50%ホルムアミド

0.5% SDS

30 100 μ g/ml 酵母 tRNA

100 μ g/ml 変性サケ精子 DNA

(2) で作製した cDNA プローブ (5x10⁵ cpm/ml)

反応温度 42℃

反応時間 16時間

【0037】(5) その後、ナイロンメンブランを各々500ml の 2x SSC (0.1% SDS を含む)、0.2x SSC、0.1x SSC の溶液の順番でそれぞれ30分間ずつ60℃で洗浄した後、オートラジオグラフィを行った。得られたオートラジオグラフィより、正常肝臓の cDNA プローブとの結合量に比べ肝癌の cDNA プローブとの結合の多い遺伝子を選択した。(全部で31個の遺伝子が得られたうちの1個を選択した。)

【0038】8. 塩基配列の決定

塩基配列の決定は、『Molecular Cloning Second Edition』chapter 13 に記載の方法に準じて行った。実際には、得られた肝癌の cDNA プローブの結合量の多い遺伝子の塩基配列の決定は、T7 sequence kitTM (ファルマ

シア製)を用いてジデオキシキナーミネイター法でpB1uescript II上に挿入した遺伝子部分の配列を読み取った。

【0039】9. ホモロジー解析

決定された遺伝子の塩基配列をDDBJ (DNA Data Base of Japan) のデータバンクに照会することで、ホモロジー解析を行った。その結果、ホモロジーの見つからない新規遺伝子であることが判明した。該遺伝子をGAD11遺伝子と命名した。該遺伝子が完全長であるかどうか確認するためにさらに以下の解析を行った。

【0040】10. cDNAライブラリーの作製

DEN投与後7カ月の肝癌組織より抽出したpolyA RNA 4μgからフルマシア製タイムセイバーcDNAシネシスキットTMを用いて、取扱説明書にしたがってcDNA合成を行った。以下にその概要を説明する。(1) ランダムプライマーを使用し、逆転写反応、DNAポリメラーゼによるDNA合成反応により二本鎖cDNAを合成し、このcDNAの両端にNot I/EcoRIアダプターを付加するためT4 DNAライゲース処理及びポリヌクレオチドキナーゼ処理を行った。これにより両端にEcoRI制限酵素切断部位を有するcDNAを得た。

(2) このcDNAを、λgt11クローニングベクター(ファルマシア製)にT4 DNAリガーゼを用いて挿入し、GIGAPACK GoldTM(ストラタジーン製)を用いてパッケージングを行い、λファージの中にcDNAを導入し、完全長遺伝子の単離に用いた。

【0041】11. 完全長遺伝子の単離

完全長遺伝子の単離は『Molecular Cloning Second Edition』Chapter 2に記載の方法に準じて行った。以下にその概要を示す。

(1) 10. で作製したcDNAを含むライブラリーをY1090r-大腸菌に接触させた後、0.7%寒天を含むNZY培地に混合し、1.5%寒天を含むNZY培地プレートに撒いた。42℃で6時間培養を行うことでcDNAを大量に含むブラークを形成させた後、このプレート上にニコセロウスフィルター(イモビコンTM、ミリポア製)を載せ、形成されたブラークを転写した。

(2) このフィルターを水酸化ナトリウムでブラーク中のcDNAを変性させた。変性の条件は7. (1)に記載の条件と同じで行った。

(3) 変性させたcDNAを75℃で2時間熱処理して固定し、ハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションに用いたプローブには、8. で塩基配列を決定したGAD11遺伝子部分をランダムラベリング(ペーリンガーマンハイム製のランダムラベリングキットを使用した)で³²P-dCTP標識したものをを用い

た。ハイブリダイゼーションの条件及び洗浄の条件は文献に記載の条件にしたがった。

(4) ハイブリダイゼーションの結果、フィルターに固定したcDNAから得られたポジティブシグナルに対応するブラークから完全長のGAD11遺伝子を得た。

【0042】<実施例2>肝癌特異的な蛋白質のアミノ酸配列及び該蛋白質をコードする遺伝子の決定

1. 遺伝子の大量調製

GAD11遺伝子について以下の操作を行い、遺伝子を大量調整した。

(1) 実施例1の11. (4)又は(5)でNZY寒天培地上に形成させたブラークから回収したλファージをSM溶液に懸濁した。

(2) (1)の懸濁液50μlとY1090r-大腸菌20μlを混合し、37℃、15分間放置した。

(3) その後、100μg/mlアンピシリンを含む10ml NZY培地に(2)で混合した溶液を移し、37℃で一晩培養し、菌が溶菌したことを確認した。

(4) 8000rpm、5分間遠心分離し、上清を回収した。

【0043】(5) 該上清に、5M NaClを1ml、ポリエチレングリコール6000を1.1gを加え、溶かした。

(6) 該溶液を氷上に1時間置き、その後10000rpm、4℃で20分間遠心分離を行った。

(7) 沈殿を回収し、700μlのSM溶液に懸濁した。

(8) クロロホルムを500μl加えて攪拌し、残った大腸菌を溶かした。

(9) 5000rpm、10分間遠心分離し、水層を回収した。

(10) これに、1mg/ml RNase A、5mg/ml DNase I (共にシグマ製)を各1μlずつ加え、37℃で1時間放置したのち、20%ポリエチレングリコール6000 (0.8M NaCl)を600μl加え、氷上に30分間放置した。

【0044】(11) 4℃で、15000rpm、20分間遠心分離した後、沈殿を回収した。

(12) この沈殿に500μlのSM溶液、50μlの5M NaCl、50μlの0.5M EDTAを加え、更に、400μlのフェノールを加えて攪拌し、ファージを溶かしてcDNAを遊離させた。

(13) 該溶液を室温で15000rpm、5分間遠心分離した後、水層を回収した。該液に1mlのエタノールを加え、15000rpm、20分間遠心分離し、液層を捨てた。

(14) 70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し、100μlのTE溶液(Tris-Cl pH8.0 10mM、1mM EDTA)に沈殿を溶かし、DNA溶液を得た。

【0045】2. GADII 遺伝子のベクターへの挿入
GADII 遺伝子を以下の操作により、ベクターに挿入した。

DNA溶液 (1. で調製したもの)	20 μ l
EcoRI (宝酒造製)	2 μ l
RNase A (日本ジーン製)	1 μ l
10xH buffer (宝酒造製)	10 μ l
滅菌水	67 μ l
合計	100 μ l

反応温度 37℃

反応時間 4時間

【0046】(2) その後、0.7% NuSieveTM GTGアガロース (宝酒造製) 電気泳動を行い、2.1 kb p付近のDNAを切り出し、このDNAを GENE CLEAN IITM (ファコシ製) を用いて取扱説明書の通りにDNAを回収した。

pBluescript II (1 μ g/ μ l)	2 μ l
10xH buffer	2 μ l
EcoRI	2 μ l
滅菌水	14 μ l
合計	20 μ l

反応温度 37℃

反応時間 一晩

【0047】②その後、2 μ l 1M Tris pH 8.0を加え、1 μ l Bacterial Alkaline Phosphatase (宝酒造製)を加え、65℃で1時間放置した。

③その後、フェノール/CHCl₃ 抽出を常法に従い★

DNA ((2) で調製したもの)	5 μ l
pBluescript II EcoRI 切断物 (③で調製したもの)	1 μ l
10倍ライゲーションバッファー (日本ジーン製)	2 μ l
T4リガーゼ (日本ジーン製)	1 μ l
滅菌水	11 μ l
合計	20 μ l

反応温度 16℃

反応時間 2時間

【0048】3. 遺伝子の大肠菌への導入
2. で作製したGADIIを挿入したベクターを、常法に従い反応液を全て、E. coli JM109コンピテントセル (宝酒造製) に混合し、氷上で30分間、42℃で45秒間、氷上で3分間反応させた後、SOC培地 900 μ lを加え、37℃、1時間置き、ベクターをE. coli JM109に導入した。その後、E. coli JM109を回収した。なお、このGADII遺伝子を導入した組み換え体大肠菌を工業技術院生命科学研究所に寄託した (受託番号FERM P-15165)。

【0049】4. 遺伝子の塩基配列の決定

(1) 4. で回収したE. coli JM109をLB寒天培地 (100 μ g/mlアンピシリン、0.1mM

* (1) DNA切断の系を以下のようにし、制限酵素EcoRI (宝酒造製) によるDNA切断を行った。

* (3) DNAを組み込むpBluescript II (ストラタジーン製) にEcoRIで切断後脱リン酸化を行った。
①EcoRIでの切断は、以下の系で行った。

★2回行い酵素を失活させた後、エタノール沈殿により精製した後、TE溶液にて100 μ g/ μ lに溶かした。
④2) で得られたDNAと、③で得られたpBluescript IIを、以下の系で反応させ、DNAをベクターに挿入した。

PTG、0.004% X-gal 含有) に撒き、37℃で16時間培養した。

(2) 形成されたコロニーのうち、白色のコロニーを20 ml LB培地 (100 μ g/mlアンピシリン含有) に植え、37℃で16時間培養した

(3) その後、12000 rpm、1分間遠心分離して集菌し、MagiMini prepTM (プロメガ製) に従いプラスミドDNA溶液を回収した。

(4) 回収したDNAをT7シーケンシングキット (ファルマシア製) に従い、シーケンシス、全塩基配列を決定した。GADII遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号2に示す。

【0050】6. アミノ酸配列の決定

5. で決定した塩基配列から、GADII蛋白質のアミ

ノ酸配列を決定した。GADII 蛋白質のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【0051】<実施例3> GADII 遺伝子のノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析
GADII 遺伝子のノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を、『Current Protocols in Molecular Biology』Chapter 4に記載されているホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動を用いる方法に従って行った。用いた polyA RNA の量は、各サンプルにつき 500 ng で、①正常肝臓及び DEN 投与後7カ月の肝癌の polyA RNA を用いたもの、②実施例1の2. で調製した肝癌飼料の全ての polyA RNA を用いたものの2種類について行った。

【0052】(1) 実施例2で pBluescript II 上にのせた GADII 遺伝子を制限酵素処理にて、ベクターから切り出した。

(2) その後、制限酵素処理液をアガロースゲル電気泳動にかけて、目的とする GADII 遺伝子を分離した。

(3) (2) で分離した GADII 遺伝子を GENE CLONE IITM (フナコシ製) を用いて精製した。

(4) 精製した GADII 遺伝子をランダムプライム DNA ラベリングキット (ベリンガー・マンハイト製) を用いて製品取扱説明書に従い、 α -P32 dCTP (アマシャム製) を用いて ³²P-dCTP 標識した GADII 遺伝子プローブを作製した。

(5) (4) で作製したプローブを用いて、まず正常肝臓と7カ月肝癌を用いた系において、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を行った。この結*

5' GAA TTC CCC ATG GCT GAC TCA AAA CC
A CTC AGA A 3'式(1)
5' GCA CTG ACC AGA AAT GGC AC 3'式(2)

②増幅された遺伝子を EcoRI, SacI で切断して切り出した。

【0055】③別に、GADII 遺伝子を挿入した pBluescript II の GADII 遺伝子の C 末端側に存在する残りの部分を BglII で切断した。その後、クローフラグメントで平滑化した後、SacI で切断して遺伝子を切り出した。

④②で切り出した遺伝子と③で切り出した遺伝子とを Ligation Pack (日本ジーン製) を用いてその取扱説明書に従い連結し、GADII 遺伝子を作製した。

⑤図4に示すヒスチジンタグを導入した pET3a ベクターを EcoRI, SmaI で切断した後、脱リン酸化処理を行った。

⑥⑤で作製した GADII 遺伝子と⑤で作製されたベクターとを Ligation Pack (日本ジーン製) を用いてその取扱説明書に従い連結した。

*果、肝癌で有意に増加する遺伝子として GADII 遺伝子が検出された。これより GADII 遺伝子を用いることで、肝臓と正常肝臓の識別が可能となること、すなわち、肝癌の診断が可能であることが判明した。

【0053】(6) 次に、同じプローブを用いて、実施例1の2. で調製した肝癌飼料全ての polyA RNA を用いたものを使用した系でノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を行った。結果を図3に示す。図3で、GADII mRNA の位置を示すバンドを矢印で指している。この図より、発癌誘導に伴い GADII 遺伝子の有意な増加が見られることが判明した。これより、GADII 遺伝子を用いて発癌初期の肝癌の識別も可能であること、すなわち肝癌の早期診断が可能であることが判明した。

【0054】<実施例4> GADII 蛋白質の発現

1. GADII 遺伝子の大量調製

(1) 組み換えベクターの作製

GADII 遺伝子を図4に示されるヒスチジンタグを導入した pET3a ベクターに組み込んだ。以下にその詳細を記す。

①まず、実施例2の2. で作製した GADII 遺伝子を挿入した pBluescript II ベクターを、PCR 法 (『Current protocols in molecular biology』chapter 15に記載) により、次の式 (1) 及び式 (2) の塩基配列のプライマーを用いて、GADII 遺伝子の第一メチオニン部分をコードする塩基配列の前に EcoRI サイトを導入して増幅した。

5' GAA TTC CCC ATG GCT GAC TCA AAA CC
A CTC AGA A 3'式(1)
5' GCA CTG ACC AGA AAT GGC AC 3'式(2)

なお、上記過程でのベクターに挿入された遺伝子の確認は、挿入断片の塩基配列を読み取って行った。

(2) GADII 遺伝子の大量調製

GADII 遺伝子を組み込んだプラスミドを『Molecular Cloning Second Edition』chapter 1に記載の方法で大量調製した。

【0056】2. GADII 蛋白質の発現

(1) 大量調製したプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS に導入した。

(2) 該大腸菌をアンピシリン 100 μ g/ml、クロラムフェニコール 25 μ g/ml を含む LB 培地で培養し、分光光度計 (ベックマン製) で濃度が 600 nm の波長で 0.5 になった時点で IPTG を 0.5 mM になるように加え、GADII 蛋白質の発現誘導を行った。この培養は計 41 行った (800 ml x 5 本)。

【0057】3. GADII 蛋白質の精製

(1) 2時間後、遠心分離により大腸菌を回収し、Lysis Buffer (10mM Tris-HCl pH7.9, 10% Glycerol, 0.5M NaCl, 0.1% NP40, 5mM 2-Mercaptoethanol, 1mM PMSF) に懸濁した後4℃でソニケーションにより大腸菌を破碎し、Beckman Optima XL-80を使用し、50, 2Tiローターで1800rpm、4℃で15分間遠心分離した。

(2) その後、上清を取り、1Mイミダゾール (pH 7.5) を終濃度10mMになるように加え、N-イアガロースTM (キアゲン製) を用いて非変性条件で取扱ひ説明書の通りに精製した。

(3) 精製された標品の一部を、2x SDS サンプルバッファーと等量ずつ混合し、3分間沸騰水中でボイルした後、10% SDS-PAGE 電気泳動にかけ、クマシーブリリアントブルーで染色したところ、56kD付近にバンドが現れ、得られた蛋白質がGADII蛋白質であることが確認された。

【0058】(4) 次に残った精製GADII蛋白質を(3)と同様に2x SDS サンプルバッファーで処理し、5mmゲル厚の10% SDS-PAGE 電気泳動にかけ、泳動終了後ゲルを4℃にて0.25MのKClで30分間染色を行った。

(5) 56kD付近の白く染色された目的のバンドをカッターナイフで切り出し、そのバンドをカッターナイフでさらに細かく刻んだ。

(6) バイオラッド社製のモデル422エレクトロリユーターを用い、取扱説明書に従い20mAで8時間蛋白質の溶出を行った。

(7) 溶出された蛋白質を該エレクトロリユーターの取扱説明書に従い回収した。蛋白質溶液の保存は-80℃にて行った。

【0059】<実施例5>抗GADII抗体の検出
『Current protocols in molecular biology』chapter1に記載の方法にしたがってウェスタンブロットを行うことで抗GADII抗体の検出を行った。以下にその方法を示す。

(1) 実施例4で作製・精製した組み換え体GADII蛋白質を10% SDS-PAGE 電気泳動後、日本エーデル社製のセミドライ転写装置 (ポール型) を用いイモビリンPメンブラン (ミリポア社製) に蛋白質の転写を行った。転写条件は、日本エーデル社の推奨する条件に従った。

【0060】(2) その後、正常ラットの血清を50倍、100倍、250倍及び500倍に、実施例1の1.で採取した肝癌ラットの血清を250倍、500倍、5000倍、10000倍に3%スキムミルク溶液で希釈し、組み換え体GADII蛋白質が転写されたゲ

ルに掛けてそれぞれ該GADII蛋白質と反応させた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ラットIgG抗体を反応させ、さらに該アルカリフォスファターゼを基質 (NBT、BCID (共にプロメガ製)) と反応させ呈色させた。結果を図1及び図2に示す。

【0061】図1Aは、正常ラットの血清とDEN投与7カ月後肝癌ラット (2例) の血清をそれぞれGADII蛋白質と反応させたウェスタンブロットの結果を表す図である。HCC1及びHCC2はそれぞれ肝癌ラットのレーンである。Normalは正常ラットのレーンである。GADII蛋白質の位置を示すバンドを矢印で指している。この図より、DEN投与7カ月後肝癌ラットの血清それぞれから抗GADII抗体が検出されることが認められる。

【0062】図1Bは、正常ラットの血清を50倍及び1000倍に希釈したものでならびにDEN投与7カ月後肝癌ラットの血清を5000倍希釈及び10000倍希釈したものをそれぞれGADII蛋白質と反応させたウェスタンブロットの結果を表す図である。HCCは肝癌ラットのレーンであり、Normalは正常ラットのレーンである。数字は希釈倍率を表す。GADII蛋白質の位置を示すバンドを矢印で指している。この図より、正常ラット血清からは、500倍希釈でも抗体の検出が認められないが、DEN投与7カ月後肝癌ラットの血清からは、10000倍に希釈しても抗体の検出が認められる。

【0063】図1Cは、正常ラットの血清ならびにDEN投与後1、3、5及び7カ月経過後肝癌ラットの血清をそれぞれGADIIと反応させたウェスタンブロットの結果を表す図である。HCCは肝癌ラットのレーンであり、Normalは正常ラットのレーンである。数字はDEN投与後の経過月数を表す。GADII蛋白質の位置を示すバンドを矢印で指している。この図より、DEN投与1カ月後すでに抗GADII抗体が検出されることが認められる。

【0064】図2には正常ラットの血清及びDEN投与7カ月後肝癌ラットの血清の250倍希釈及び500倍希釈での結果を表す。25Nが正常ラットの血清を250倍希釈したもの、25Tが7カ月肝癌ラットの血清を250倍希釈したものを表す。50N、50Tについても数字が希釈倍率 (数字の10倍希釈)、Nが正常ラットの血清、Tが7カ月後肝癌ラットの血清を表す。また、Pがポジティブコントロールを表す。GADII蛋白質の位置を示すバンドを矢印で指している。

【0065】これより肝癌を有するラットの血清からGADII蛋白質と反応する抗GADII抗体が検出されることが確認された。すなわち、抗GADII抗体が存在すること、しかも肝癌ラットでは血清中に遊離して存在することが実際に示された。さらに、該GADII抗

体が肝癌ラットでは正常ラットに比して明らかに多く発現していることが示された。このことは、組み換え体GADII蛋白質を用いたウェスタンブロットにより、抗原抗体反応を利用して、肝癌ラットで発現している抗GADII抗体を検出することにより、肝癌の発症をスクリーニング出来ることを示す。また、ラット以外の動物であっても該動物型GADII蛋白質（例えば、ヒト型GADII蛋白質）を用いることで該動物の肝癌（例えば、ヒトの肝癌）の診断が可能となる可能性を示唆している。また、サンプルは血清に限らず、他の体液でもよい。また、組織でもよい。

【0066】希釈倍率については、結果から明らかなように10000倍でも抗GADII抗体が検出されており、高倍率希釈が可能ながことが明らかとなった。また、今回は用いなかったが、組み換え体GADII蛋白質を用いたELISA等の抗原抗体反応を利用した他の方法であっても同様に肝癌のスクリーニングが可能である。

【0067】<実施例6>GADII遺伝子の組織間分布の確認

組織間分布の確認には、Rat MTN BlotTM（クローテック製）を用いた。この製品は、ノーザンブロットハイブリダイゼーションを行うために市販されている、ラット各組織のpolyA RNAをプロットしたメンブランである。このメンブランを『Molecular Cloning Second Edition』pp7. 3-7. 84に記載の方法、及び製品取り扱い説明書に従いGADII遺伝子プローブを用いてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。用いたGADII遺伝子プローブの作製方法を下記に示す。

（1）実施例2でpBluescript II上にのせたGADII遺伝子を制限酵素処理にて、ベクターから切り出した。

（2）その後、制限酵素処理液をアガロースゲル電気泳動にかけて、目的とするGADII遺伝子と分離した。

（3）（2）で分離したGADII遺伝子をGENE CLEAN ITM（ファコシ製）を用いて精製した。

【0068】（4）精製したGADII遺伝子をランダムプライムDNAラベリングキット（ペーリンガー・マンハイム製）を用いて製品取扱説明書に従い、 α -P32 dCTP（アマシャム製）を用いて³²P-dCTP標識したGADII遺伝子プローブを作製した。GADII遺伝子プローブの結果を図5に示す。図5で、GADII mRNAの位置を示すバンドを矢印で指している。この図から明らかなように、GADII遺伝子は肝臓、腎臓で強く発現していて、長さは異なるが肺でも発現している。この結果から肝臓以外にも例えば、腎臓や肺で癌の発症にともないGADII遺伝子の発現の増加が予想される。このことと実施例3の結果から、組み換え体GADII蛋白質を用いて抗GADII抗体を検出するこ

とで腎臓癌や肺癌のスクリーニングが可能であることが示唆される。

【0069】<実施例7>抗GADII抗体の作製

1. 抗GADII抗体の作製

実施例4で作製・精製したGADII蛋白質を『Antibodies A Laboratory Manual』chapter 5に記載の方法にしたがってウサギに免疫し、抗GADII抗体を作製した。

【0070】2. ウェスタンブロット

『Current protocols in molecular biology』chapter 1に記載の方法にしたがって行った。

（1）実施例4で作製・精製したGADII蛋白質をナイロンメンブラン（イモビロンP（ミリポア製））上にウェスタンブロットを行った。

（2）その後、抗GADII抗体をメンブラン上のGADII蛋白質と反応させた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ウサギIgG抗体を反応させ、さらに該アルカリフォスファターゼを基質（NBT、BCID（共にプロメガ製））と反応させ呈色させた。結果を図6に示す（図中の数字は蛋白質の分子量を表し、単位はkDである。）。図で、GADII蛋白質の位置を示すバンドを矢印で指している。図から明らかなように、56 kDにGADII蛋白質のバンドが検出され、これより抗GADII抗体がGADII蛋白質と反応することが確認された。

【0071】<実施例8>GADII蛋白質の肝癌の診断への利用の検討

（1）実施例1で作製した肝癌組織（DEN投与後7カ月）及び正常肝臓組織それぞれ1gを5mlの2xSDS sample bufferでホモジナイズした後、3分間ボイルすることで肝癌組織抽出液及び正常肝臓組織抽出液を得た。

（2）該抽出液、実施例4で精製したGADIIを12.5%SDS-PAGE電気泳動にかけた後、ウェスタンブロットを行った。なお、蛋白質量は、別に同様の電気泳動を行ったゲルをクマシンプリアントブルーで染色したのち、比色することで行った。

【0072】（3）その後、実施例4で作製した抗GADII抗体を該抽出液と反応させた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ウサギIgG抗体を反応させ、さらに該アルカリフォスファターゼを基質（NBT、BCID（共にプロメガ製））と反応させ呈色させた。結果を図7に示す（図中の数字は蛋白質の分子量を表し、単位はkDである。）。図の右端のレーンは対照の実施例4で精製したGADII蛋白質のレーンである。ヒスチンタグの分だけ分子量が大きくなっている。真中のレーンは肝癌組織のレーンである。左端のレーンは正常ラット肝臓式のレーンである。図7で、GADII蛋白質の位置を示すバンドを矢印で指してい

る。図から明らかのように、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法の結果と同様に、肝癌及び肝癌発現過程で有意なGADI I Ⅰ蛋白質の増加が確認された。すなわち、該抗体は、肝癌と正常肝臓の識別および発現過程の肝臓と製法肝臓の識別が可能であり、肝癌の早期診断等に使用できることが確認された。

【0073】

【発明の効果】本発明のGADI I Ⅰ又蛋白質はGADI I Ⅰ遺伝子を検出することで癌のスクリーニング、特に早期肝癌のスクリーニングが可能となる。また、GADI I Ⅰ遺伝子それぞれの一部又は全部を用いることで癌、特*

*に肝癌の発症を遺伝子の発現レベルでスクリーニングすることが可能となる。また、GADI I Ⅰ蛋白質を用いて抗GADI I Ⅰ抗体又はGADI I Ⅰリガンドを体液中から検出することで、癌、特に肝癌の発症を簡便にスクリーニングすることが可能となる。

【0074】配列番号：1

配列の長さ：506

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

```

Met Ala Asp Ser Lys Pro Leu Arg Thr Leu Asp Gly Asp Pro Val Pro
1           5           10           15
Val Glu Ala Leu Leu Arg Asp Val Phe Gly Ile Val Val Asp Glu Ala
20           25           30
Ile Arg Lys Gly Thr Asn Ala Ser Glu Lys Val Cys Glu Trp Lys Glu
35           40           45
Pro Glu Glu Leu Lys Gln Leu Leu Asp Leu Glu Leu Gln Ser Gln Gly
50           55           60
Glu Ser Arg Glu Arg Ile Leu Glu Arg Cys Arg Ala Val Ile His Tyr
65           70           75           80
Ser Val Lys Thr Gly His Pro Arg Phe Phe Asn Gln Leu Phe Ser Gly
85           90           95
Leu Asp Pro His Ala Leu Ala Gly Arg Ile Ile Thr Glu Ser Leu Asn
100          105          110
Thr Ser Gln Tyr Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Met Glu
115          120          125
Glu Glu Val Leu Lys Lys Leu Arg Ala Leu Val Gly Trp Asn Thr Gly
130          135          140
Asp Gly Val Phe Cys Pro Gly Gly Ser Ile Ser Asn Met Tyr Ala Ile
145          150          155          160
Asn Leu Ala Arg Phe Gln Arg Tyr Pro Asp Cys Lys Gln Arg Gly Leu
165          170          175
Arg Ala Leu Pro Pro Leu Ala Leu Phe Thr Ser Lys Glu Cys His Tyr
180          185          190
Ser Ile Thr Lys Gly Ala Ala Phe Leu Gly Leu Gly Thr Asp Ser Val
195          200          205
Arg Val Val Lys Ala Asp Glu Arg Gly Lys Met Ile Pro Glu Asp Leu
210          215          220
Glu Arg Gln Ile Ser Leu Ala Glu Ala Glu Gly Ser Val Pro Phe Leu
225          230          235          240
Val Ser Ala Thr Ser Gly Thr Thr Val Leu Gly Ala Phe Asp Pro Leu
245          250          255
Asp Ala Ile Ala Asp Val Cys Gln Arg His Gly Leu Trp Leu His Val
260          265          270
Asp Ala Ala Trp Gly Gly Ser Val Leu Leu Ser Arg Thr His Arg His
275          280          285
Leu Leu Asp Gly Ile Gln Arg Ala Asp Ser Val Ala Trp Asn Pro His
290          295          300

```

25

26

Lys Leu Leu Ala Ala Gly Leu Gln Cys Ser Ala Leu Leu Leu Arg Asp
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Leu Leu Lys Arg Cys His Gly Ser Gln Ala Ser Tyr Leu
 325 330 335
 Phe Gln Gln Asp Lys Phe Tyr Asn Val Ala Leu Asp Thr Gly Asp Lys
 340 345 350
 Val Val Gln Cys Gly Arg Arg Val Asp Cys Leu Lys Leu Trp Leu Met
 355 360 365
 Trp Lys Ala Gln Gly Gly Gln Gly Leu Glu Trp Arg Ile Asp Gln Ala
 370 375 380
 Phe Ala Leu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Glu Ile Lys Lys Arg Glu Gly
 385 390 395 400
 Phe Glu Leu Val Met Glu Pro Glu Phe Val Asn Val Cys Phe Trp Phe
 405 410 415
 Val Pro Pro Ser Leu Arg Gly Lys Lys Glu Ser Pro Asp Tyr Ser Gln
 420 425 430
 Arg Leu Ser Gln Val Ala Pro Val Leu Lys Glu Arg Met Val Lys Lys
 435 440 445
 Gly Thr Met Met Ile Gly Tyr Gln Pro His Gly Thr Arg Ala Asn Phe
 450 455 460
 Phe Arg Met Val Val Ala Asn Pro Ile Leu Val Gln Ala Asp Ile Asp
 465 470 475 480
 Phe Leu Leu Gly Glu Ala Gly Ala Ser Gly Pro Gly Pro Val Ser Cys
 485 490 495
 Phe Leu Ser Leu Pro His Pro Ser Ser Ala
 500 505

【0075】配列番号: 2

* 鎖の数: 二本鎖

配列の長さ: 2121

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

* 配列の種類: cDNA to mRNA

配列

CCGCCTCTGA ACCCGTCGT TGAACCCCTCT CTGAACCTTC CTGAAGCTGG AAGATTTCAC 60
 CCTG ATG GCT GAC TCA AAA CCA CTC AGA ACC CTG GAT GGG GAC CCT GTG 109
 CCT GTG GAG GCT TTG CTC CGG GAC GTG TTT GGG ATT GTC GTA GAT GAG 157
 GCC ATT CGG AAG GGG ACC AAT GCC TCT GAG AAG GTC TGC GAA TGG AAG 205
 CAG CCT GAA GAG CTC AAG CAG CTG CTG GAC TTG GAG CTG CAG AGC CAG 253
 GGC GAG TCT AGG GAG CGG ATC CTG GAG CGC TGC CGG GCT GTG ATT CAT 301
 TAC ACT GTC AAG ACT GCT CAC CCC CGG TTC TTC AAC CAG CTC TTC TCA 349
 GGA TTA GAT CCC CAT GCT CTG GCC GGG CGC ATC ATT ACG GAG AGC CTC 397
 AAT ACC AGC CAG TAC ACA TAT GAG ATT GCC CCC CTC TTT GTG CTC ATG 445
 GAA CAG GAG GTG CTG AAG AAA CTC CGT GCC CTT GTG GGC TGG AAC ACT 493
 GGG GAT GGG GTC TTC TGT CCT GGT GGT TCC ATC TCT AAC ATG TAC GCC 541
 ATA AAC CTG GCC CGC TTT CAG CGC TAC CCA GAC TGC AAG CAG AGG GCC 589
 CTC CGG GCC CTG CCA CCC TTG GCC CTC TTC ACT TCA AAG GAG TGC CAC 637
 TAC TCC ATC ACC AAG GGA GCT GCT TTT CTG GGA CTT GGC ACC GAC AGT 685
 CTC CGA GTG GTC AAG GCT GAT GAG AGA GGG AAG ATG ATC CCT GAG GAT 733
 CTG GAG AGC CAG ATC ACT CTG GCA GAG GCT GAG GGC TGC GTG CCA TTT 781
 CTG GTC AGT GCC ACC TCT GGT ACC ACC GTG CTA GGG GCC TTT GAC CCC 829
 CTC GAT GCA ATT GCC GAT GTT TGC CAG GGT CAC GGG CTG TGG TTA CAC 877
 GTG GAT GCC GGC TGG GGT GGG AGC GTC CTC GTG TCC CGG ACA CAC AGG 925
 CAT CTC CTG GAT GGC ATC CAG AGG GCT GAC TCC GTG GCC TGG AAC CCT 973

CAC AAG CTT CTC GCC GCG GCG CTG CAG TGC TCT GCT CTT CTT CTC CGG 1021
 GAC ACC TCG AAC CTG CTC AAG CGG TGC CAC GGG TCC CAG GCC AGC TAC 1069
 CTC TTC CAG CAA GAC AAG TTC TAC AAC GTG GCT CTG CAC ACC CGA GAC 1117
 AAG GTG CTG CAG TGT GCG CGC CGC GTG CAG TGT CTG AAG CTG TGG CTC 1165
 ATG TGC AAG GCG CAG GGT GGG CAA GGG CTG GAG TGG CGC ATC GAC CAG 1213
 GCC TTT GCT CTC ACT CGG TAC TTG GTG CAG GAG ATA AAA AAG CGG GAA 1261
 GGA TTT GAG TTG CTC ATG CAG CCC GAG TTC CTC AAC CTG TGC TTC TGG 1309
 TTT GTG CCT CCC AGC CTC GCG GGG AAG AAG GAG AGC CCA GAT TAC AGC 1357
 CAG AGG CTG TCT CAG GTG GCC CCT GTG CTC AAG GAG CGC ATG CTG AAG 1405
 AAG CGA ACC ATG ATG ATC GGC TAC CAG CCC CAT GGG ACC CGG GCC AAC 1453
 TTC TTC CGA ATG GTG CTC GCC AAC CCC ATA CTC GTG CAG GCC GAT ATA 1501
 GAC TTC CTT CTC GCG GAG GCT GGA GCG TCT GGG CCA GGA CTT CTC AGC 1549
 TGC TTC CTC TCT CTC GCC CAC CCA AGC TCT CCA TAAGCTCTCT GCTTCCGAAA 1602
 AGCCACCTTT CTAGGAAACA GTGGCCTTGA CTGTCTGAGC CCCACACAC TAACCTCTCT 1662
 AGCTAAGTAT TGGCTGCCAG ACGGTCTCTA AGCACACTAC ACTCTCTTCT TACGAAATGT 1722
 GCTTCTTTTA ACTCGGTCAT ACTGCTACAC ACCGCTTAATA CCAGCACTGG GGAGCGACAG 1782
 CGACACACAA GCAGATCTCT TGACATTGAG GCCAGCCTGG TCTACAGAGC TGGCCTACAC 1842
 AGAAAAAATA CCTCTCTCAA AAAAAAGAA AGCAAGCAAC AAAGAAGCAA AAAGAAAGAA 1902
 ATATTITTTA TTAAGATTAT GTCTATAAAA AATTGTTATT AATATGAGAG ATATGCTACG 1962
 ATCTATTAAG AAAGCTAGAT ATCGCGGCTG GCGATTGAG TCAGTGGTAG AGCCCTTGGC 2022
 TAGCAAGCCC AAGGCCCTGG GTTCGGTCCC CAGCTTCGAA AAAAAGGAAC CACAAAAAAA 2082
 ACGGCCCGCT CTAGAACTAG TGGATCCCC GCGCTGCAG 2121

【0076】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1Aは、正常ラットの血清と肝癌ラットの血清をそれぞれGAD11蛋白質と反応させたウェスタンブロットの結果を表す図である。図1Bは、正常ラットの血清を希釈したもの及び肝癌ラットの血清を希釈したものをそれぞれGAD11蛋白質と反応させたウェスタンブロットの結果を表す図である。図1Cは、正常ラットの血清ならびにDEN投与後1、3、5及び7カ月経過後肝癌ラットの血清をそれぞれGAD11と反応させたウェスタンブロットの結果を表す図である。

【図2】正常ラットの血清と肝癌ラットの血清の希釈液をそれぞれGAD11蛋白質と反応させたウェスタンブロット結果を表す図である。

【図3】正常肝臓及び肝癌のmRNAについて、GAD11遺伝子をプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーション解析を行った結果を表す図である。

【図4】実施例4及び実施例6で使用するpET3aベクターを表す図である。

【図5】GAD11遺伝子の各臓器での発現を表す図である。

【図6】組み換え体GAD11蛋白質と抗GAD11抗体とを反応させたウェスタンブロットの結果を表す図で

ある。

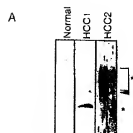
【図7】ラット肝臓から抽出したGAD11蛋白質と抗GAD11抗体とを反応させたウェスタンブロットの結果を表す図である。

【0077】

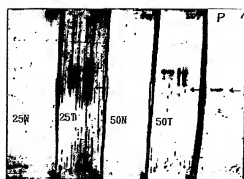
【符号の説明】

- 1 2 : 正常肝臓のmRNAのレーン
- 30 1 3 : DEN投与12時間後の肝臓のmRNAのレーン
- 1 4 : DEN投与24時間後の肝臓のmRNAのレーン
- 1 5 : DEN投与48時間後の肝臓のmRNAのレーン
- 1 6 : DEN投与1ヵ月後の肝臓のmRNAのレーン
- 1 7 : DEN投与3ヵ月後の肝臓のmRNAのレーン
- 1 8 : DEN投与5ヵ月後の肝臓のmRNAのレーン
- 1 9 : DEN投与7ヵ月後の肝臓のmRNAのレーン
- 2 0 : GAD11 mRNAのバンドの位置
- 3 3 : 心臓のmRNAのレーン
- 3 4 : 脳のmRNAのレーン
- 40 3 5 : 脾臓のmRNAのレーン
- 3 6 : 肺のmRNAのレーン
- 3 7 : 肝臓のmRNAのレーン
- 3 8 : 骨格筋のmRNAのレーン
- 3 9 : 腎臓のmRNAのレーン
- 4 0 : 精巣のmRNAのレーン

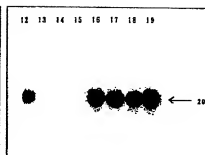
【図1】



【図2】

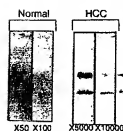


【図3】

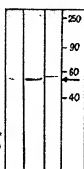


A

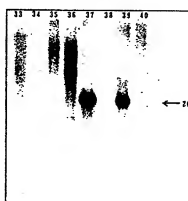
B



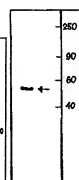
【図7】



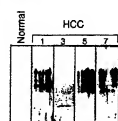
【図5】



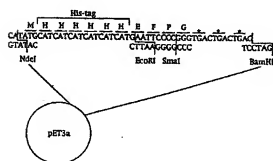
【図6】



C



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

// A 61 K 39/395

識別記号

庁内整理番号

F I

A 61 K 39/395

技術表示箇所

C 07 H 21/04

C 12 N 1/21

15/09

C 12 P 21/02

21/08

Z N A

7823-4B

C 07 H 21/04

C 12 N 1/21

C 12 P 21/02

21/08

C 12 Q 1/68

E

T

B

C

A

(17)

特開平9-203734

C 1 2 Q 1/68
(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:19)

9282-4 B

C 1 2 N 15/00

Z N A A